

Untersuchungen
zur Spezifität des indirekten
Immunfluoreszenzantikörpertests (IFAT)
zum Nachweis von Antikörpern
gegen verschiedene Babesia-Arten

Juliane Plössl

Diss. München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0076

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DES INDIREKTEN
IMMUNFLUORESZENZANTIKÖRPERTESTS (IFAT) ZUM NACHWEIS
VON ANTIKÖRPERN GEGEN VERSCHIEDENE BABESIA-ARTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Juliane Plössl
aus
Nabburg

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Der Nachweis von Babesia-Infektionen bei Rind, Pferd, Hund und Maus mit Hilfe des IFAT (anhand der Literatur).....	2
III. Eigene Untersuchungen.....	13
A. Material und Methoden.....	13
B. Ergebnisse.....	21
1. Reaktionen der Immunseren mit homologen und heterologen Babesien-Antigenen.....	21
2. Reaktionen der Infektionsseren mit homolo- gen und heterologen Babesien-Antigenen....	25
IV. Besprechung der Ergebnisse.....	33
V. Zusammenfassung und Summary.....	39
VI. Literaturverzeichnis.....	43

Lebenslauf

I. Einleitung

Eine Babesieninfektion wird direkt durch den Erregernachweis im gefärbten Blutaussstrich und indirekt mit verschiedenen serologischen Methoden nachgewiesen. Der direkte Parasitennachweis gelingt meist nur bei ausreichender Parasitendichte im Blut während der akuten Erkrankung. Die Babesienart wird dabei auf Grund ihrer Morphologie, Lage im Erythrozyten und Pathogenese identifiziert.

Latente Parasitenträger werden durch den serologischen Nachweis spezifischer Babesienantikörper erfaßt. Jedoch ist bislang die Möglichkeit der serodiagnostischen Differenzierung der Babesienarten nicht eindeutig geklärt.

Ergebnisse im indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest geben allerdings den Hinweis, daß diese Methode zur Identifizierung der Babesienspezies eingesetzt werden kann.

Ziel meiner Arbeit war es, die Eignung des IFAT zur artspezifischen Diagnose von Babesieninfektionen bei Pferd, Rind, Hund und Maus zu überprüfen.



II. Der Nachweis von Babesia-Infektionen bei Rind, Pferd, Hund und Maus mit Hilfe des IFAT (anhand der Literatur)

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde erstmals von WELLER und COONS (1954) beschrieben und hat zunehmend Eingang in die Serodiagnostik auch von Parasitosen gefunden. KUVIN und Mitarb. (1962) sowie VOLLER und BRAY (1962) führten sie in die Malaria-Diagnostik ein. Dann wurde sie zum Nachweis intraerythrozytärer Parasiten bei Tieren eingesetzt, so von SCHINDLER und WOKATSCH (1965) für Theilerien.

LÜHR und ROSS (1968) überprüften erstmals die Brauchbarkeit des IFAT zur Babesiendiagnostik beim Rind. Sie machten auf Fehlerquellen und Grenzen der Testinterpretation aufmerksam, die vor allem durch die Verwendung von Ausstrichen des stark mit Parasiten befallenen, unvermischten und ungewaschenen Blutes als Antigen entstehen. Auch SCHINDLER und MEHLITZ (1968) waren unbefriedigt über die unterschiedliche Verteilung der parasitierten Blutzellen in dem sie umgebenden Serum. Unterschiede der einzelnen Antigenchargen, unregelmäßig auftretende Hintergrundfluoreszenz und die unspezifische Fluoreszenz von Thrombozyten sowie Leukozyten erschwerten ferner die Beurteilung spezifischer Reaktionen und führten zu mangelnder Reproduzierbarkeit des Tests. Neben der Verwendung einheitlicher Mengen von Serumverdünnungen und Konjugat forderten sie ein verbessertes uniformes Antigen.

ROSS und LÜHR (1968) wiesen nun mit dem IFAT eine Babesia bigemina-Infektion beim Rind nach, wobei sie ein von ihnen verbessertes Antigen einsetzten. Durch sorgfältiges Waschen der parasitenhaltigen Erythrozyten mit Pufferlösung vor Anfertigung dünner Ausstriche konnten sie ein Babesienantigen ohne störende Hintergrundfluoreszenz herstellen. Dabei fanden

sie den Test hochspezifisch und genau (100% in 100 bekannten Kontrollseren), sowie ausreichend sensitiv, um bis zu 2 Jahre zurückliegende Infektionen nachzuweisen.

Beim Nachweis von *Babesia divergens*-Antikörpern fand TREES (1978) in splenektomierten Rindern mit dem IFAT, daß die Verwendung von EDTA als Antikoagulans beim Sammeln und Waschen des Blutes die Antigenherstellung erleichtert, ohne negative Beeinflussung der serologischen Reaktion.

Die Antigenherstellung modifizierten BROCKLESBY, ZWART und PERIE (1971) für ihre IFA-Tests zur Bestimmung einer großen Babesienart in England; sie trugen dicke Tropfen gewaschener, mit *Babesia major* oder *B. bigemina* infizierter Erythrozyten auf Objektträger auf und erhöhten damit die Parasitendichte pro Blickfeld. Da die Seren in hohen Titern mit *B. major*, in niederen mit *B. bigemina* reagierten, konnten sie die untersuchte Babesienart eindeutig als *B. major* identifizieren.

ANDERSON, MAGNARELLI und KURZ (1979) versuchten ein noch reineres Antigen für den IFAT herzustellen und zwar zum Nachweis von Babesien-Antikörpern in Nagerpopulationen von Connecticut. Gewaschene, mit *Babesia microti* infizierte Mäuse-Erythrozyten wurden mit einem Zellfraktionator aufgespalten, die freigesetzten Parasiten durch Zentrifugieren der Suspension von anderen korpuskulären Teilchen getrennt und in PBS resuspendiert. Die Autoren bewahrten die Parasitensuspension bei -65°C auf und trugen sie erst bei Bedarf als Antigen auf Objektträger auf. Damit konnten sie spezifische *Babesia microti*-Antikörper in den Nagern feststellen. Alle Seren experimentell infizierter Tiere waren im IFAT positiv (1:8 - 1:256).

PAYNE (1978) setzte Ausstriche aus gewaschenen, mit *B. major* infizierten Erythrozyten, die zuvor mit Glycerol versetzt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren waren, als Antigen im IFAT ein. Im Vergleich mit Antigen aus frischen Erythrozyten sanken die Titer des positiven *B. major*-Standardserums nur unwesentlich.

Verschiedene Fixierungen des Antigens wurden von TAMURA und Mitarb. (1980) beim Nachweis von *B. gibsoni*-Antikörpern verglichen. Als Fixierlösungen wählten sie absolutes Aceton, absolutes Äthanol, 95%iges Äthanol, 5%ige Essigsäure in 95%igem Äthanol, 1%ige Essigsäure in 95%igem Äthanol, 10%iges Formalin und Heißluft (100°C), als Waschmedien destilliertes Wasser, 0,9%ige NaCl-Lösung und 3,8%ige Natriumcitratlösung. Ausstriche von mit *B. gibsoni* infizierten Erythrozyten fixierten sie jeweils 5, 10 oder 15 Minuten und untersuchten sowohl nicht-behandelte als auch inaktivierte Anti-Seren. Die Antigenität von nicht fixiertem und mit Aceton fixiertem Antigen blieb 12 Monate bei -20°C unverändert. Auch wenn nicht fixiertes, ferner aceton- und heißluftfixiertes Antigen gute Ergebnisse lieferten, erwies sich die Acetonfixierung bei 4°C als optimal; Aceton konnte das Hämoglobin besser aus Erythrozyten entfernen als die anderen Fixiermedien. Da keine Titerunterschiede zwischen nicht inaktivierten und bei 60°C inaktivierten Seren auftraten, erschien eine Inaktivierung der Seren nicht notwendig; nach 20minütiger Serum-Inaktivierung bei mehr als 63°C sank sogar der Antikörper-Titer merklich ab.

TODOROVIC und GARCIA (1978) untersuchten im IFAT neben Serum von mit *Babesia* spp. infizierten Tieren auch Trockenblut auf Filterpapier. Wie in den IFA-Tests von BURRIDGE, KIMBER und McHARDY (1973) zum Nachweis von *B. bigemina*-Antikörpern stimmten die Ergebnisse beider Methoden gut überein; die

Verwendung von Filterpapierstreifen verminderte nicht die Empfindlichkeit und Spezifität des IFAT.

CALLOW und Mitarb. (1979) kritisierten die subjektive Beurteilung spezifischer Antigen-Antikörperreaktionen im IFAT, nachdem sie die Antikörperbildung bei B. argentina-Infektionen von Rindern nach der Chemotherapie beobachteten. Zwar zeichnete sich der Test in der ersten Untersuchungsreihe (CALLOW und Mitarb., 1974) durch ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit aus, jedoch war die Festlegung des Grenztiters zwischen positiven und negativen Reaktionen schwierig. Auch in der zweiten Untersuchungsreihe überlappten sich die Titer nicht infizierter Tiere, die starke unspezifische Reaktionen gaben, mit solchen von infizierten, nur schwach positiv reagierenden Tieren.

Nachdem BLEWETT und ADAM (1978) den IFAT kritisch auf mögliche Fehlerquellen geprüft hatten, untersuchten sie mit ihm das Vorkommen von Rinderbabesiosen (B. divergens) in Schottland. Die Genauigkeit des Tests bei wiederholtem Routineablesen von Kontrollseren betrug 95% für positive und 91% für negative Seren. Der Prozentsatz falscher Resultate, die entweder auf unspezifischen Reaktionen von Seren oder technischen Fehlern in der Durchführung des Tests beruhten, konnte auch nicht durch eine unterschiedliche Herstellung von Antigen oder Konjugat vermindert werden. Sie halten trotzdem die Aussagekraft des IFAT als Screening-Test für ausreichend.

Auch DONELLY, JOYNER und CROSSMAN (1972) hielten den IFAT zum Nachweis von B. divergens-Infektionen für geeignet; in ihren Untersuchungen stimmten die Ergebnisse völlig mit dem Infektionsstatus der 22 Tiere (17 infizierte und 5 nicht infizierte) überein. GOLDMAN und PIPANO (1974) konnten mit dem Test vom 34. - 615. Tag nach der Immunisierung von Rindern

gegen *B. berbera* spezifische Antikörper feststellen.

Beim Vergleich des IFAT mit der KBR zur Diagnose von *B. argentina* und *B. bigemina* durch TODOROVIC und LONG (1976) reagierten die beiden Methoden zwar gleich spezifisch, im IFAT traten aber Antikörper im Mittel 2,5 Wochen früher auf, und die Titer waren höher und blieben länger bestehen. Zum gleichen Ergebnis kamen bei der vergleichenden Serodiagnose anderer Rinderbabesiosen JOHNSTON und TAMMEMAGI (1969), KUTTLER, ADAMS und TODOROVIC (1971) und FUJINAGA und MINAMI (1981).

Bei den Untersuchungen von APPLEWHAITE, CRAIG und WAGNER (1981) dagegen traten positive Reaktionen in der KBR eher auf als im IFAT. Nachdem aber mit dem IFAT bei wesentlich mehr Tieren *B. bigemina*- bzw. *B. bovis*-Antikörper festgestellt werden konnten als mit der KBR, hielten auch sie die Immunfluoreszenz-Methode für geeigneter.

Ähnliche Ergebnisse erhielten DONELLY und Mitarb. (1980) bei der Untersuchung von Pferden in Kuwait und im Sultanat von Oman mit IFAT und KBR. Sie ermittelten mit dem IFAT einen höheren Prozentsatz an latent mit *B. equi* oder *B. caballi* infizierten Tieren. Die mit der KBR erfaßten Antikörper fielen schneller ab, wogegen der IFAT über längere Zeit positiv blieb. Auch traten im IFAT keine Kreuzreaktionen auf. MERKLE (1983) stellte im ELISA bei der Untersuchung von *B. caballi*-Seren unspezifische Reaktionen und Kreuzreaktionen fest, die im IFAT nicht auftraten.

Die bisherigen Ergebnisse bei der vergleichenden Serodiagnose von Babesien-Infektionen lassen erkennen, daß der IFAT sensibler und spezifischer reagiert als andere Tests. Die Untersuchungen weisen sogar auf die Möglichkeit einer Identifizierung verschiedener Babesienarten mit dem IFAT hin.

ZWART und Mitarb. (1968) setzten den IFAT erstmals zur Differenzierung von Babesienarten vom Rind ein. Seren von *B. bigemina*- und *B. major*-Tieren reagierten nur in niedrigen Verdünnungsstufen mit dem heterologen Antigen, in sehr hohen Verdünnungsstufen mit dem homologen Antigen. Daraus schlossen die Autoren auf das Vorkommen gemeinsamer und speziesspezifischer Antigenbestandteile von *B. bigemina* und *B. major*. Auf Grund hoher Titer im homologen und niedriger Titer im heterologen System unterschieden JOYNER und Mitarb. (1972) klar zwischen Antikörpern gegen *B. divergens* und solchen gegen *B. major*. GOLDMAN, PIPANO und ROSENBERG (1972) konnten dagegen in Serumproben von Rindern, die mit *B. bigemina* oder *B. berbera* infiziert waren, keine Kreuzreaktionen feststellen; sie besitzen scheinbar keine ähnlichen Antigenstrukturen.

LEEFLANG und PERIE (1972) untersuchten mit dem IFAT Antigen-Beziehungen zwischen *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. major* und *B. divergens*. Zwischen *B. major* und *B. bovis* gab es keine Kreuzreaktionen. Im übrigen reagierten die spezifischen Immunseren mit den heterologen Antigenen nur in niedrigen Verdünnungen, mit dem homologen Antigen stets in hohen Titern. Da aber die Titer auch in den verschiedenen heterologen Systemen Unterschiede zeigten, wurden neben speziesspezifischen auch gruppenspezifische Antigene vermutet.

GOLDMAN und ROSENBERG (1974) teilten wegen Kreuzreaktionen im IFAT *B. divergens* in die Gruppe I, *B. bovis*, *B. argentina* und *B. berbera* in die Gruppe II sowie *B. major* in die Gruppe III ein. Da *B. major*-Antiserum sowohl mit Antigen der Gruppen I und II als auch mit Antigen von *B. bigemina*, einer großen Babesienart, nur in niedrigen Titern reagierte, ordneten sie diese Art zwischen die kleinen und großen Babesien ein.

Ferner konnten WEILAND und Mitarb. (1980) positive Reaktionen von *B. divergens*-Antiseren von Jungrindern mit dem heterologen *B. rodhaini*-Antigen im IFAT nachweisen.

Nach JOHNSTON, PEARSON und LEATCH (1973) reagierten *B. bigemina*- und *Anaplasma marginale*-Antiseren von Rindern nicht mit *B. argentina*-Antigenen. Andererseits zeigten 6 verschiedene *B. argentina*-Stämme keine unterschiedlichen Reaktionen. MORZARIA, BROCKLESBY und HARRADINE (1977) konnten mit dem IFAT 3 verschiedene Piroplasmen des Rindes in England unterscheiden. *Theileria mutans*, *B. major* und *B. divergens* waren eindeutig zu differenzieren. Dagegen war ihnen eine Unterscheidung von einzelnen *B. major*-Stämmen (Essex und Kent) ebensowenig möglich wie BROCKLESBY, ZWART und PERIE (1971). Da CALLOW, KANHAI und VANDENBERGHE (1981) ebenfalls eine enge Antigen-Beziehung zwischen *B. bovis*-Stämmen aus Australien und Mozambique feststellten, scheint eine serologische Differenzierung im IFAT nicht möglich zu sein.

LUDFORD und Mitarb. (1972) untersuchten die Antigen-Beziehungen zwischen *B. argentina* des Rindes und den menschenpathogenen *Plasmodium vivax* und *P. falciparum*. Positive *B. argentina*-Seren reagierten in niedrigen Verdünnungsstufen mit *Plasmodium falciparum*, nicht aber mit *P. vivax*-Antigenen. Umgekehrt gaben etwa 15% der positiven *P. falciparum*- und *P. vivax*-Seren hohe IFAT-Titer mit *B. argentina*-Antigenen. Sind diese Kreuzreaktionen spezifisch, lassen sie sich mit dem Vorkommen gemeinsamer Antigene erklären, sind sie dagegen unspezifisch, beruhen sie vermutlich auf den individuell unspezifischen Immunantworten.

NICHOLLS, IBATA und RODAS (1980) konnten mit dem IFAT Misch- und Monoinfektionen mit *B. bovis* und *Anaplasma marginale* in Milchviehherden in Bolivien nachweisen. Von 421 gesammelten

Seren reagierten 13% mit *B. bovis*-, 4% mit *Anaplasma marginale*-Antigen und 83% mit beiden Antigenen in hohen Titern.

Es wird auch versucht, neu bei Rindern isolierte Babesienarten zu identifizieren. So grenzten FUJINAGA, MINAMI und ISHIHARA (1980) mit der Immunfluoreszenztechnik eine große Babesienart des Rindes aus Japan von *B. major* (British and Dutch strain) und *B. bovis* (Mijara strains) ab. Ebenso wurde eine von *Hyalomma marginatum* übertragene Rinderbabesie durch den IFAT von GRAY und DE VOS (1981) von *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. bovis* und *B. major* abgegrenzt und als *B. occultans* benannt.

MADDEN und HOLBROOK (1968) wiesen als erste mit dem IFAT *B. caballi*-Infektionen bei Pferden nach. Da dünne Ausstriche ungewaschener Erythrozyten als Antigen dienten, war eine Differenzierung zwischen schwach positiven und negativen Reaktionen schwierig; Kreuzreaktionen mit *B. equi*-Antigen ließen sich nicht feststellen. MERKLE (1983) erzielte mit gewaschenen, parasitenhaltigen Erythrozyten im IFAT ähnliche Ergebnisse. Mit Titern von 1:256 im homologen System reagierende *B. caballi*-Seren erreichten mit *B. equi*-Antigen nur Titer bis 1:40; auch Kreuzreaktionen mit *B. rodhaini*-Antigen traten nicht auf. Seren von mit *B. equi* experimentell infizierten Ponies erbrachten mit *B. caballi*-Antigen nur Titer von 1:40.

CALLOW und Mitarb. (1979) werteten ebenfalls den IFAT zum Nachweis von *Babesia equi*-Infektionen in Australien aus; neben homologem Antigen verwendeten sie auch Antigen von *B. bigemina* und *B. bovis* aus Rindern dieser Region. Homologes Antigen brachte Titer bis 1:7290. Während aber *B. equi*-Antigen nicht mit *B. bovis*- und *B. bigemina*-Seren reagierte, war *B. bovis*-Antigen mit Seren von *B. equi*-Pferden in

niedrigen Titern positiv. Auch nach REHBEIN und HEIDRICH-JOSWIG (1983) reagierten weder *B. caballi*-Pferdeseren noch *B. bigemina*-Rinderseren mit Piroplasmen- oder Schizonten-Antigen von *B. equi*. Weiterhin konnten sie in *B. equi*-Seren spezifische Antikörper sowohl mit Piroplasmen- als auch mit Schizonten-Antigen aus Lymphozytenkulturen nachweisen.

RISTIC, LYKINS und SMITH (1971) isolierten *B. canis* und *B. gibsoni* aus Hunden und untersuchten deren Antigenbeziehungen u.a. mit dem IFAT. Bei einer Serumverdünnung von 1:10 gelang ihnen keine Differenzierung der beiden Babesienarten; weitere Serumverdünnungen wurden nicht untersucht. Auch in den Tests von ANDERSON, MAGNARELLI und SULZER (1980) reagierte *B. canis*-Hundeserum mit *B. gibsoni*-Antigen mit einem Maximaltiter von 1:1024, während *B. gibsoni*-Serum im heterologen System (*B. bigemina*-, *B. argentina*-, *B. racoon origin*-, *B. equi*-, *P. falci-parum*- und *P. brasilianum*-Antigenen) wesentlich geringere Titer (max. 1:64) als im homologen System (1:65536) erbrachte. Außerdem untersuchten TAMURA und Mitarb. (1980) die Brauchbarkeit des IFAT zur Diagnose von *B. gibsoni*-Infektionen. *B. gibsoni*- und *Haemobartonella canis*-Hundeseren reagierten nur mit dem homologen Antigen.

Dagegen stellten WEILAND und KRATZER (1979) Kreuzreaktionen zwischen *B. canis*, *B. gibsoni* und *B. rodhaini* fest. Dies ermöglichte ihnen, Antikörper von 5 experimentell mit *B. canis* oder *B. gibsoni* infizierten Hunden mit *B. rodhaini*-Antigen zu ermitteln.

Immunfluoreszenzuntersuchungen von LYKINS und Mitarb. (1975) ergaben zwischen *B. canis* und *B. microti* nur geringe Titer (1:40) im Vergleich zu hohen Titern in den jeweiligen homologen Systemen. ANDERSON, MAGNARELLI und KURZ (1979) prüften die Spezifität eines *B. microti*-Antigens im IFAT; *B. bigemina*-,

B. argentina-, *B. caballi*- und *B. equi*-Seren reagierten nicht damit. Umgekehrt titrierten COX und TURNER (1970) *Babesia microti*-Seren von Mäusen gegen das homologe Antigen und gegen die heterologen *B. rodhaini*-, *Plasmodium vinckei*- und *P. chabaudi*-Antigene; es traten keine Kreuzreaktionen auf. Positive menschliche *B. microti*-Seren erbrachten im IFAT bei CHISHOLM und Mitarb. (1978) ebenfalls nur niedrige Titer mit *B. equi*, *B. bigemina*, *B. argentina*, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* und *P. brasilianum*; dagegen kam es im homologen System zu hohen Titern.

Indirekte Immunfluoreszenztests durch BENACH und Mitarb. (1979) mit *B. microti*-Immunseren von Patienten und Hochimmunseren von Hamstern erbrachten keine Titerunterschiede bei Verwendung von Antigen verschiedener *B. microti*-Isolate aus Long Island im Vergleich mit Antigen von *B. microti* (Stamm Gray). Eine stamm-spezifische Diagnose war bei *B. microti* mit dem IFAT nicht möglich. HENKEL (1982) folgerte aus seinen Ergebnissen im IFAT, daß sich hinter den beiden *B. microti*-Stämmen (Sylvenstein, King strain) 2 verschiedene Arten verbergen und der Stamm Grafrath mit Stamm Sylvenstein übereinstimmt. Es traten nämlich nur geringe Kreuzreaktionen zwischen *B. microti* (Stamm Sylvenstein) und *B. microti* (King strain) auf; Immunseren gegen *B. microti* (Stamm Grafrath) reagierten stark mit *B. microti* (Sylvenstein)-Antigenen, waren aber gegen *B. microti* (King strain) negativ. Außerdem erbrachte der IFAT eine klare Trennung zwischen *B. microti*-Stämmen, *B. divergens* und *B. rodhaini*. Schließlich wurde von HICKERTON und JONES (1981) der IFAT zur Differenzierung von *B. rodhaini*, *B. microti* und *B. muratovi* eingesetzt. Sie erhielten im Vergleich zu hohen Titern im homologen stets niedrige Titer im heterologen System.

TODOROVIC (1975) kritisierte neben der Subjektivität des IFAT auch seinen Mangel an Spezifität; er führte die unspezifischen Reaktionen oder Kreuzreaktionen im IFAT auf die Verwendung von ganzen Parasiten als Antigen zurück.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere zur Antigengewinnung verwendete ich NMRI-Mäuse, Gerbils und 2 Beagle-Hunde aus institutseigener Zucht. Die 20-25 g schweren Mäuse und Gerbils wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20°C gehalten und mit Altromin-Mäusestandarddiät sowie Wasser ad libitum versorgt. Die Beagle-Hunde wogen 15 und 20 kg, waren in Einzelboxen untergebracht und erhielten Altromin-Hundehaltungsdiät, gelegentlich Happy-Dog-Fleischersatz und Wasser ad libitum. Beide Tiere wurden 2 Wochen ante infectionem splenektomiert. Der Gewinnung von Hochimmunseren dienten 26, jeweils 2-3 kg schwere Kaninchen. Sie wurden in Metallkäfigen einzeln gehalten sowie mit Altromin-Kaninchenhaltungsdiät gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Aus der Gruppe der großen Babesien wählte ich *B. canis*, *B. major* und *B. caballi*, von den kleinen *B. gibsoni*, *B. divergens* und *B. equi* aus; außerdem führte ich meine Untersuchungen an *B. microti*, *B. rodhaini* und *B. musculi* durch, die auf Grund ihrer Polymorphie weder den großen noch den kleinen Babesienarten zugeordnet werden. Die Infektion erfolgte entweder mit Erreger-Stabilaten, die in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt wurden, oder mit babesienhaltigem Blut frisch infizierter Tiere. NMRI-Mäusen inokulierte ich i.p. *Babesia rodhaini*, *B. musculi* und *B. microti* sowie Gerbils *B. divergens*. Hunden verabreichte ich jeweils *B. canis*- oder *B. gibsoni*-Stabilat zur einen Hälfte subkutan, zur anderen intravenös. Weiterhin gewann ich je 150 ml Blut von einem mit *Babesia equi* (Parasitämie 40%) und einem mit *B. caballi* (Parasitämie 1,5%) infizierten Pony sowie von einem mit *B. major* infizierten Rind (Parasitämie 16,5%).

Das Prinzip des von WELLER und COONS (1954) eingeführten Immunfluoreszenztests beruht auf der Eigenschaft bestimmter Farbstoffe (Fluorochrome), unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbares Licht auszusenden. Mit Fluorochromen wie Isothiocyanat oder Rhodamin können Proteine, also auch Antikörper markiert werden. Mit Fluorochromen markierte Immunglobuline (Ig, IgM, IgG) werden als Konjugate bezeichnet.

Der indirekte Immunfluoreszenzantikörpertest wird insbesondere zum Nachweis von Serum-Antikörpern eingesetzt. Bei Überschichtung eines Antigen-Präparates mit dem zu untersuchenden Serum reagieren die spezifischen Antikörper mit dem Antigen und bilden einen Antigen-Antikörperkomplex. Durch Zugabe des tierartspezifischen Konjugates kann der Antigen-Antikörperkomplex im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden, da die an das Antigen gebundenen spezifischen Antikörper mit den fluorochromierten Antiglobulinen reagieren.

Zur Herstellung von Antigen für den IFAT tötete ich jeweils 3 mit *Babesia rodhaini*, *B. microti* sowie *B. musculi* infizierte NMRI-Mäuse und *B. divergens*-Gerbils bei Parasitämien von 40 - 50% und gewann das Blut unter Zusatz von 3,8%iger Natriumzitratlösung aus dem Herzen. Den von *B. canis* und *B. gibsoni* befallenen Hunden (Parasitämie von 30%) wurden 10 ml Blut aus der Vena cephalica antebrachii entnommen und ebenso wie das *B. equi*, *B. caballi* und *B. major* enthaltende Blut zur Vermeidung der Blutgerinnung mit 3,8%iger Natriumzitratlösung vermischt.

Ich zentrifugierte die Blutproben bei 3000 Upm (1500 g) 10 Minuten lang in einer Hettich Universal K 25-Zentrifuge und pipettierte Plasma und Leukozytenschicht ab. Die Erythrozyten resuspendierte und zentrifugierte ich wieder in PBS mit einem

pH-Wert von 7,2 bis 7,4 (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,15 g, KH_2PO_4 0,2 g, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, CaCl_2 0,1 g, Aqua dest. ad 1,0 l) ; dies wiederholte ich mindestens dreimal, bis der Überstand klar war. Nach dem Waschen der Erythrozyten verdünnte ich das Sediment mit PBS 1:6 bis 1:10, je nach Höhe der Parasitämie und Erythrozytendichte. Die Suspension trug ich als Antigen mit einer Pasteur-Pipette auf Objektträger mit 12 Feldern (Fa. Hölzel) auf und sog den Überstand wieder ab, um eine dünne gleichmäßige Verteilung der Babesiensuspension zu erhalten.

Kontrolliert wurde die Erythrozyten- und Parasitenverteilung durch Färbung mit Giemsa und Acridine orange (WINTER, 1967); Antigen, bei dem sich die Erythrozyten zumindest in den Randgebieten der Felder nicht überlagerten, erwies sich für den IFAT am geeignetsten. Die Objektträger ließ ich über Nacht bei 18 - 20°C lufttrocknen, wickelte die beschrifteten Objektträger in Seidenpapier, schweißte sie unter Zugabe von Kieselgel in Plastikbeuteln ein und bewahrte sie bis zum Gebrauch bei -20°C in Gefriertüten auf.

Zur Gewinnung somatischen Antigens für die Herstellung von Immunseren wurden *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. divergens* über mehrere Passagen in Mäusen vermehrt. Die Blutgewinnung erfolgte, wie beschrieben, auf dem Höhepunkt der Parasitämie (*B. rodhaini*, *B. musculi* und *B. microti* 60 - 70%, *B. divergens* 50 - 70%, *B. canis* 55% und *B. gibsoni* 33%).

Hunden entnahm ich jeweils 300 ml Blut aus der Vena jugularis mit evakuierten Glasflaschen, die schon einen ACD-A-Stabilisator enthielten (Fa. ASID). Von dem mit *B. equi*, *B. caballi* und *B. major* infizierten Blut verarbeitete ich jeweils 140 ml. Nach Zentrifugieren, Verwerfen von Plasma und Leukozytenschicht

sowie dreimaligem Waschen resuspendierte ich die Erythrozyten auf das Ausgangsvolumen in PBS.

Die Suspension wurde zur Hämolyse der babesienhaltigen Erythrozyten mit aqua dest. im Verhältnis 1:10 versetzt. Die Isotonie stellte ich nach einer Minute durch Zugabe von gleichem Volumen doppelt konzentrierter PBS (NaCl 16,0 g, KCl 0,4 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 2,3 g, KH_2PO_4 0,4 g, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, CaCl_2 0,2 g, Aqua dest. ad 1,0 l) wieder her, um eine Schädigung der Parasiten zu verhindern. Ich zentrifugierte das Hämolysat 30 Minuten bei 4°C mit 13000 Upm (27000 g) in einer Sorvall RC 28 Zentrifuge mit einem GSA Rotor. Nach Dekantieren des Überstands wurde der Bodensatz in PBS resuspendiert, portioniert und als somatisches Gesamtantigen für die spätere Immunisierung bei -20°C aufbewahrt. Analog stellte ich zusätzlich Kontrollantigen aus nicht infizierten Erythrozyten der verschiedenen Wirtstierarten her.

Zur Gewinnung von spezifischem Hochimmunserum und Kontrollserum immunisierte ich stets 2 Kaninchen mit dem somatischen Antigen einer Babesienart bzw. Kontrollantigen aus den Erythrozytenhüllen der Wirtstierarten. Pro Tier wurden 2-3 ml Antigen mit 3 ml komplettem Freund'schen Adjuvans (Fa. Behring) emulgiert und an der seitlichen Brustwand, auf mehrere Stellen verteilt, s.c. injiziert. Nach 4 Wochen erfolgte die erste Boosterung mit 4 ml Antigen ohne Adjuvans i.p., die zweite Boosterung 10 Tage später analog.

10 Tage darauf wurde bei allen Tieren Serum gewonnen und portioniert bei -20°C eingefroren aufbewahrt. So erhielt ich spezifische Antiseren und Kontrollseren. Als Negativ-Serum vom Kaninchen diente mir ein Serum-Pool von 7 nicht immunisierten Tieren. Neben Hochimmunseren von Kaninchen wurden folgende ,

Babesien-Antiseren von natürlich oder experimentell infizierten Tieren verwendet:

<u>Maus:</u>	<i>Babesia microti</i>	Antiserum	3 Wochen p.i. gewonnen
	" <i>rodhaini</i>	"	4 " " "
	" <i>divergens</i>	"	3 " " "
	" <i>musculi</i>	"	6 " " "
	Negativ-Serum		Serum-Pool von 5 nicht infizierten Mäusen
<u>Hund:</u>	<i>Babesia canis</i>	Antiserum	natürliche Infektion
	" <i>gibsoni</i>	"	4 Wochen p.i. gewonnen
	Negativ-Serum		Serum-Pool von 3 nicht infizierten Hunden
<u>Rind:</u>	<i>Babesia major</i>	Antiserum	5 Wochen p.i. gewonnen
	" <i>bovis</i>	"	4 " " "
	" <i>divergens</i>	"	4 " " "
	Negativ-Serum		von einem nicht infizierten Rind
<u>Pferd:</u>	<i>Babesia equi</i>	Antiserum	3 Wochen p.i. gewonnen
	" <i>equi</i>	"	7 " " "
	" <i>equi</i>	"	19 " " "
	" <i>caballi</i>	"	1 " " "
	" <i>caballi</i>	"	3 " " "
	" <i>caballi</i>	"	7 " " "
	Negativ-Serum		von einem nicht infizierten Pferd

Babesia rodhaini-Antiserum produzierte ich in weißen NMRI-Mäusen. Die Tiere wurden mit einer Parasitämie von durchschnittlich 30% am 10. und 13.Tag p.i. mit 20 mg/kg

Berenil (4,5%ig) i.m. therapiert. Serum gewann ich 4 Wochen p.i..

Vor Durchführung des IFAT wurden die Objektträger nach dem Auftauen eine halbe Stunde bei 4°C und eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. In der ersten Versuchsreihe verwendete ich unfixiertes Antigen, für die zweite Reihe fixierte ich das Antigen 5 Minuten in Aceton (4°C).

Zur Untersuchung der Spezifität des IFAT testete ich zunächst alle spezifischen Antiseren von Kaninchen gegen die homologen Antigene und konnte so die Hochimmunseren mit den höchsten Titern im homologen System feststellen. Diese hochtitrigen Immunseren sowie die Kontrollseren und das Negativ-Serum von Kaninchen ließ ich dann in verschiedenen Verdünnungen mit jedem heterologen Babesienantigen reagieren. Dabei setzte ich die Seren sowohl unbehandelt als auch nach Inkubation mit Absorptionszellen und schließlich nach Inaktivierung und anschließender Inkubation mit Absorptionszellen ein. Die Inaktivierung der Seren erfolgte 30 Minuten lang bei 56°C. Die Inkubation der Kaninchenseran mit lyophilisierten, stabilisierten Schaferythrozyten sollte die gegen die Erythrozytenhüllen gerichteten Antikörper vermindern. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Seren bei 3000 Upm (1500 g) abzentrifugiert.

Analog zu den Kaninchenseran testete ich auch die Infektionseren sowie Negativ-Seren der Wirtstiere gegen jedes Babesienantigen aus. Von allen Seren fertigte ich in Mikrotiterplatten mit IFAT-Puffer eine Verdünnungsreihe in zweifacher Verdünnungsstufe beginnend mit 1:16 an; es folgten 1:32, 1:64, usw. (IFAT-Puffer: 1:20 verdünntes Phosphat-Puffer-Konzentrat der Fa. Behring). Ich übertrug 0,01 ml jeder Serumver-

dünnung auf das entsprechende, mit Antigen beschichtete Reaktionsfeld eines Objektträgers, wobei ich mit der stärksten Serumverdünnung begann. Kontrollserum und Negativserum wurden stets mitgeführt.

Um unspezifische Fluoreszenzen der Antigene oder eine unspezifische Bindung von Konjugat festzustellen, trug ich hier anstelle des Serums nur IFAT-Puffer oder Konjugat auf. Die Objektträger wurden anschließend bei 37°C 45 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert, kurz unter Leitungswasser abgespült, 4 x 5 Minuten in PBS gewaschen und mit Löschpapier getrocknet. Anschließend verdünnte ich das tierartsspezifische Konjugat mit IFAT-Puffer 1:20 bzw. 1:40. Folgende Konjugate standen mir dafür zur Verfügung:

Anti-Kaninchen IgG: fluorescein-konjugierte IgG-Fraktion von der Ziege (Fa. Cappel) Verdünnung 1:20

Anti-Hund IgG: fluorescein-konjugierte IgG-Fraktion von der Ziege (Fa. Cappel) Verdünnung 1:40

Anti-Pferd IgG: fluorescein-konjugierte IgG-Fraktion von der Ziege (Fa. Cappel) Verdünnung 1:20

Anti-Rind IgG: fluorescein-konjugierte IgG-Fraktion vom Kaninchen (Fa. Cappel) Verdünnung 1:20

Anti-Maus IgG: fluorescein-konjugierte Antikörper vom Schaf (Fa. Pasteur) Verdünnung 1:20

Die Konjugatverdünnungsstufe, bei der die spezifischen Reaktionen noch nicht abnehmen, unspezifische Fluoreszenzen aber gering sind, erwies sich am geeignetsten. Stets wurde zu je

1 ml Konjugatverdünnung noch 0,1 ml einer Stammlösung von Evans blue (1:100) gegeben. Von dieser Lösung tropfte ich nun 0,01 ml auf jedes Antigenfeld auf. Die Objektträger wurden wieder 45 Minuten in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert, dann auf die gleiche Art gewaschen und getrocknet. Nach vollständigem Trocknen deckelte ich sie unter Verwendung von gepuffertem Glycerin (pH-Wert 7,6) ein. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Fa. Leitz Auflicht-Mikroskop) bei einer 6,3 x 40 fachen Vergrößerung. Als positiv wurde gewertet, wenn über 50% der Babesienformen deutlich fluoreszierten.

B. Ergebnisse

Beim Auftragen von IFAT-Puffer anstelle des Serums und ohne anschließende Konjugatüberschichtung stellte ich keine unspezifische Fluoreszenz der Babesien unter dem Fluoreszenzmikroskop fest. Trug ich nur die verschiedenen Konjugate statt des Serums auf, waren auch keine fluoreszierenden Babesien zu erkennen; diese Beobachtung schließt eine unspezifische Bindung der Konjugate an die unterschiedlichen Babesienantigene aus.

Da also keines der von mir hergestellten Babesienantigene unspezifisch fluoreszierte, konnte ich sie und die gewählten Konjugate für meine Untersuchungen zur Spezifität des IFA-Tests verwenden.

1. Reaktionen der Immunseren mit homologen und heterologen Babesien-Antigenen

Zur Untersuchung der Spezifität des IFAT testete ich sowohl Hochimmunseren von Kaninchen, die mit somatischem Antigen der verschiedenen Babesienarten und mit dem Kontrollantigen aus Erythrozytenhüllen von Maus, Hund, Rind und Pferd immunisiert waren, als auch jedes Babesienantigen aus. Grundsätzlich wurden die verschiedenen Babesienantigene zum einen unfixiert, zum anderen fixiert eingesetzt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des Tests wiederholte ich die beiden Versuchsreihen zweimal. Da die Ergebnisse stets mit den ersten Werten übereinstimmten, ist eine 100%ige Reproduzierbarkeit anzunehmen.

Zunächst verglich ich die Reaktionen der unbehandelten Immunseren mit denjenigen der Seren nach Absorption sowie nach Inaktivierung und Absorption. Beim Austesten niedriger Verdünnungsstufen unbehandelter Kontrollseren und von Babesia-

Antiseren fluoreszierten die Erythrozyten so stark, daß ein Auswerten positiver Reaktionen nicht sicher möglich war. Durch Absorption der Seren an Schafererythrozyten gelang es jedoch, die störende Fluoreszenz der Erythrozyten so zu vermindern, daß ab der Verdünnungsstufe 1:16 positive Reaktionen exakt abgelesen werden konnten. Daher begann ich mit der positiven Wertung der Reaktionen bei Titer 1:16. Das nach Absorption bzw. Inaktivierung und Absorption der Immunsereen zu befürchtende Absinken der Endtiter wurde weder im homologen noch im heterologen System festgestellt.

Alle spezifischen Hochimmunsereen reagierten mit dem homologen Antigen positiv; dabei ergaben Babesia major- und B. equi-Antiseren Titer von 1:2048, B. canis-Antiserum 1:1024, B. rodhaini- und B. divergens-Antiseren Titer von 1:512, B. musculi- und B. microti-Antiseren von 1:256 und B. caballi-Antiserum 1:128 (Tab.1). Keines der beiden Kaninchen, die mit somatischem Antigen von B. gibsoni immunisiert waren, entwickelte Titer über 1:32. Die Acetonfixierung der Antigene setzte alle diese Endtiter nur um maximal eine Stufe herab (Tab. 1).

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen reagierte der negative Serum-Pool nur mit einem Titer von 1:32 mit B. canis und B. major sowie von 1:16 mit B. divergens und B. caballi. Nach Antigenfixierung sank hier die Reaktion mit B. canis um eine Verdünnungsstufe auf 1:16; mit B. divergens wurde sie negativ, dagegen blieb die Reaktion mit B. major und B. caballi unverändert.

Auch die Kontrollseren, die gegen die Erythrozytenhüllen von Maus, Hund und Pferd gerichtet waren, erbrachten nur Titer von 1:16 und 1:32 mit B. canis, B. major, B. divergens und B. caballi; wurden die Antigene fixiert, waren hier alle Reaktionen um eine Titerstufe niedriger bzw. dann negativ. Das Kontroll-

Kaninchen- seren		Antigen von Babesia								
		mus.	rod.	mic.	can.	gib.	maj.	div.	cab.	equi
negatives Kontroll-S. gegen Erythrozyten- hüllen von		- (-)	- (-)	- (-)	32 (16)	- (-)	32 (32)	16 (-)	16 (16)	- (-)
	Maus	- (-)	- (-)	- (-)	32 (16)	- (-)	16 (-)	- (-)	- (-)	- (-)
	Hund	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	16 (-)	- (-)	- (-)	- (-)
	Rind	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
	Pferd	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	32 (16)	- (-)	32 (16)	- (-)
gegen somatisches Antigen von	B.mus.	256 (128)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	32 (32)	- (-)	- (-)	- (-)
	B.rod.	32 (16)	512 (256)	32 (16)	- (-)	- (-)	- (-)	16 (16)	- (-)	- (-)
	B.mic.	- (-)	- (-)	256 (128)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
	B.can.	- (-)	- (-)	- (-)	1024 (1024)	- (-)	256 (128)	64 (64)	256 (128)	- (-)
	B.gib.	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	32 (32)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
	B.maj.	- (-)	- (-)	- (-)	256 (256)	- (-)	2048 (1024)	32 (16)	256 (256)	- (-)
	B.div.	- (-)	- (-)	- (-)	64 (32)	- (-)	64 (64)	512 (256)	128 (128)	- (-)
	B.cab.	- (-)	- (-)	- (-)	32 (32)	- (-)	32 (16)	16 (-)	128 (128)	16 (-)
	B.equi	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	2048 (1024)

Tab.1. Reziproke Titer in Kaninchen-Hochimmunseren und Kontrollseren sowie Negativ-Serum mit unfixierten und fixierten (...) Antigenen
-: Titer<1:16

serum gegen die Erythrozytenhüllen des Rindes reagierte mit keinem der Antigene positiv (Tab.1).

Also zeigten die Antigene von *B. canis*, *B. major*, *B. caballi* und *B. divergens* eher unspezifisch positive Reaktionen als die von *B. musculi*, *B. rodhaini*, *B. microti*, *B. gibsoni* und *B. equi*.

Beim Austesten spezifischer Hochimmunseren gegen die heterologen Antigene traten zwischen *B. canis*, *B. major*, *B. divergens* und *B. caballi* Kreuzreaktionen auf (Tab.1). Dabei reagierten die spezifischen Immunseren mit den heterologen Antigenen in wesentlich niedrigeren Verdünnungen als mit dem homologen Antigen. Außerdem reagierte *B. caballi*-Antiserum in der Verdünnung 1:16 nur mit unfixiertem, nicht dagegen mit fixiertem *B. equi*-Antigen. Weiterhin brachte *B. rodhaini*-Antiserum positive Reaktionen mit *B. musculi*-, *B. microti*- und *B. divergens*-Antigen, aber nur in Titern von 1:16 und 1:32 (Tab.1) ohne Fixierung, mit Fixierung stets in Titern von 1:16. *B. musculi*-Antiserum reagierte mit unfixiertem und fixiertem *B. major*-Antigen bis zur Verdünnungsstufe 1:32. *B. microti*-, *B. gibsoni*- und *B. equi*-Antiseren erbrachten Reaktionen nur mit ihren homologen Antigenen.

Die Hochimmunseren lieferten also im IFAT speziesspezifische Ergebnisse. Die in unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufgetretenen Kreuzreaktionen zwischen *B. canis*, *B. major*, *B. caballi* und *B. divergens*, die stets unter den Endtitern in den homologen Systemen lagen, können mit dem Vorkommen sowohl gemeinsamer als auch speziesspezifischer Antigene erklärt werden. Dabei steht *B. divergens* zwischen den großen und kleinen Babesienarten, da sie als kleine Babesie mit den großen reagiert. Ebenso dürfte für die positiven Reaktionen dieser Antigene mit negativem Serum und Kontrollserum ihre ziemlich

heterogene Struktur verantwortlich sein.

2. Reaktionen der Infektionsseren mit homologen und heterologen Babesienantigenen

Ich testete die Negativ-Seren und Infektionsseren von Maus, Hund, Rind und Pferd gegen jedes Babesienantigen aus, wobei ich auch hier unfixiertes und fixiertes Antigen einsetzte. Meine Ergebnisse wurden durch zweimaliges Wiederholen der Versuchsreihe bestätigt. Da weniger als 1:16 verdünnte Seren mit allen Antigenen reagierten und dabei der Hintergrund stark fluoreszierte, wertete ich eine Babesienfluoreszenz grundsätzlich erst ab dem Titer von 1:16 als positiv. Die Infektionsseren ergaben mit den homologen Antigenen Titer von 1:256 - 1:4096 (Tab.2).

Der negative Maus-Serumpool reagierte mit keinem der Antigene. B. rodhaini- und B. divergens-Seren erbrachten nur mit den homologen Antigenen positive Reaktionen, jeweils bis zu Verdünnungen von 1:256 ohne, von 1:128 mit Fixierung. Kreuzreaktionen traten zwischen B. musculi und B. microti auf (Tab.2). Dabei erreichten die Seren mit dem heterologen Antigen nur Titer von 1:32 - 1:64 (bei fixiertem Antigen von 1:16 - 1:32); im Vergleich dazu schwankten die Titer mit den homologen Antigenen zwischen 1:256 und 1:512 (1:128 und 1:256). Außerdem reagierten B. musculi- und B. microti-Seren auch in niedrigen Verdünnungsstufen (1:16 - 1:32) mit B. major, B. divergens und B. caballi.

Bei den Hundeseren brachte schon die Negativ-Kontrolle positive Reaktionen bis 1:64; durch eine Antigenfixierung ließen sie sich teilweise vermindern und beseitigen (Tab.2). Zwischen B. canis und B. gibsoni traten zwar Kreuzreaktionen auf, aber

Infektions- seren		Antigen von Babesia							
		mus.	rod.	mic.	can.	gib.	maj.	div.	cab. equi
Maus	Neg.S.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	B.mus.	256 (128)	(-)	32 (16)	(-)	(-)	16 (16)	16 (-)	32 (32)
	B.rod.	(-)	256 (128)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	B.mic.	64 (32)	(-)	512 (256)	(-)	(-)	16 (16)	16 (-)	16 (16)
	B.div.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	256 (128)	(-)
Hund	Neg.S.	(-)	16 (-)	16 (-)	64 (32)	32 (16)	64 (32)	16 (-)	32 (32)
	B.can.	64 (32)	32 (16)	32 (16)	512 (512)	32 (16)	256 (128)	64 (64)	128 (128)
	B.gib.	(-)	(-)	16 (-)	64 (32)	256 (256)	64 (32)	16 (16)	64 (64)
Rind	Neg.S.	(-)	(-)	(-)	32 (16)	16 (-)	32 (16)	(-)	16 (-)
	B.maj.	16 (-)	(-)	(-)	256 (128)	16 (16)	512 (512)	32 (16)	64 (64)
	B.div.	(-)	(-)	(-)	64 (32)	(-)	32 (16)	256 (128)	64 (32)
	B.bov.	(-)	(-)	(-)	32 (16)	(-)	32 (32)	16 (-)	32 (16)
Pferd	Neg.S.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	16 (-)	(-)	16 (16)
	B.cab. 3 Wo.	32 (16)	16 (16)	64 (32)	512 (512)	64 (32)	128 (128)	32 (32)	4096 (2048)
	B.equi 7 Wo.	(-)	(-)	16 (-)	32 (32)	16 (-)	64 (32)	16 (-)	32 (32)

Tab.2. Reziproke Titer in Infektionsseren (3-7 Wochen nach der Infektion) und negativen Kontrollseren von Maus, Hund, Rind und Pferd mit unfixierten und fixierten (...) Antigenen
-: Titer<1:16

aufgrund der Titerunterschiede der beiden homologen (1:512 / 1:256) und heterologen (1:32 / 1:64) Systeme konnte klar zwischen ihnen unterschieden werden. Darüberhinaus ergab B. gibsoni-Serum mit den anderen Antigenen ähnliche Titer wie der negative Serumpool; B. canis aber reagierte deutlich kreuz mit B. major, B. divergens und B. caballi analog zu den Resultaten bei den Hochimmunseren. Durch Acetonfixierung änderten sich die Endtiter kaum (Tab.2).

Die Rinderseren ergaben klarere Ergebnisse. Das Negativ-Serum reagierte mit Titern von 1:16 bis 1:32 mit den unfixierten Antigenen von B. canis, B. gibsoni, B. major und B. equi; durch Fixierung der Antigene rücken diese Reaktionen teilweise in den negativen Bereich. Antiserum gegen B. bovis, einer kleinen Babesienart, reagierte nur bis zur Verdünnungsstufe 1:32 mit B. major, B. divergens, B. canis, B. caballi und B. equi, mit den anderen Antigenen gar nicht (Tab.2). B. major und B. divergens reagierten miteinander kreuz, aber nur in niedrigen Verdünnungsstufen (1:32), im Gegensatz zu den hohen Titern im homologen System (1:512 / 1:256). Außerdem gab B. major-Antiserum schwach positive Resultate mit B. musculi, B. gibsoni und B. equi-Antigen, die teilweise bei Fixierung verschwanden; höhere Titer erreichte es aber gegen B. canis und B. caballi-Antigen, mit denen auch B. divergens-Antiserum positiv reagierte.

Die Reaktionen der Rinderinfektionsseren mit den heterologen Antigenen blieben stets deutlich unter denen mit den homologen Antigenen; dabei wurden die Titer durch Acetonfixierung nicht einheitlich um eine Stufe gesenkt.

Von den Pferde-Seren reagierte die Negativ-Kontrolle nur mit B. major- und B. caballi-Antigen in der Verdünnung von 1:16 (Tab.2). B. caballi-Antiserum, mit dem höchsten Titer (1:4096)

im homologen System, reagierte zwar mit allen heterologen Antigenen, aber in wesentlich niedrigeren Verdünnungsstufen. Da es auch gegen *B. equi*-Antigen nur bis zur Verdünnung von 1:64 (bzw. 1:32 mit fixiertem Antigen) eine positive Reaktion gab und umgekehrt *B. equi*-Antiserum, mit einem Titer von 1:2048 im homologen System, mit *B. caballi*-Antigen nur bis 1:32 reagierte, konnte deutlich zwischen beiden Pferdebabesienarten unterschieden werden. Die stärksten Kreuzreaktionen erbrachte *B. caballi*-Antiserum wieder mit *B. canis*-(1:512) und *B. major*-Antigen (1:128); *B. equi*-Antiserum reagierte nur in niedrigen Verdünnungen mit den heterologen Antigenen. Bei Acetonfixierung wurden die Reaktionen der Pferdeseren nur teilweise herabgesetzt (Tab.2).

Insgesamt zeigen auch diese Ergebnisse, daß mit dem IFAT eine Differenzierung der verschiedenen Babesienarten von Maus, Hund, Rind und Pferd möglich ist. Bei jeder Wirtstierart wurden im Vergleich zu hohen Titern im homologen System stets wesentlich niedrigere Titer im heterologen erreicht. Wie bei den Hochimmunseren traten auch hier starke Kreuzreaktionen unter den großen Babesienarten *B. canis*, *B. major* und *B. caballi* sowie weniger ausgeprägt mit der kleinen Babesie *B. divergens* auf, die auf gemeinsame Teilantigene schließen lassen.

Die Acetonfixierung der Antigene brachte keine Vorteile. Nur bei den polymorphen Babesienarten *B. musculi*, *B. rodhaini* und *B. microti* ließ sie die Titer stets um eine Stufe herabsinken und somit auch Reaktionen von 1:16 in den negativen Bereich rücken. Die anderen Antigene reagierten nicht einheitlich auf die Fixierung, so daß dann insgesamt das Titerbild verzerrt wird; so sank der Endtiter von *B. equi*-Antiserum von 1:2048 mit unfixiertem *B. equi*-Antigen auf 1:1024 mit fixiertem *B. equi*-Antigen, dagegen blieb der Titer von 1:32

gegen *B. caballi*-Antigen auch nach Fixierung erhalten (Tab.2). Da außerdem bei unfixierten Antigenen die Fluoreszenz stets deutlicher war und die Endtiter sicherer abgelesen werden konnten, erwies sich die Lufttrocknung der Antigene ohne weitere Acetonfixierung als optimal.

Infektions- seren vom Pferd	Antigen von <i>Babesia</i>								
	mus.	rod.	mic.	can.	gib.	maj.	div.	cab.	equi
Negativ S. <i>B. equi</i>	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	16 (-)	- (-)	16 (16)	- (-)
3 Wo.p.i.	- (-)	- (-)	16 (-)	16 (-)	- (-)	32 (16)	- (-)	16 (16)	512 (256)
7 Wo.p.i.	- (-)	- (-)	16 (-)	32 (16)	16 (-)	64 (32)	16 (-)	32 (32)	2048 (1024)
19 Wo.p.i. <i>B. caballi</i>	- (-)	- (-)	- (-)	16 (16)	16 (-)	16 (-)	- (-)	16 (16)	64 (64)
1 Wo.p.i.	- (-)	- (-)	32 (16)	128 (128)	32 (16)	64 (32)	16 (-)	256 (256)	32 (16)
3 Wo.p.i.	32 (16)	16 (16)	64 (32)	512 (512)	64 (32)	256 (128)	64 (32)	4096 (4096)	64 (32)
7 Wo.p.i.	- (-)	- (-)	16 (-)	128 (128)	32 (16)	64 (32)	16 (-)	512 (512)	32 (32)

Tab.3. Reziproke Titer in Infektionsseren von Pferden im Verlauf der Infektion sowie negative Kontrollseren mit unfixierten und fixierten (...) Antigenen
-: Titer < 1:16

Während in Tab.2 lediglich die hochtitrigen Infektionsseren von 2 experimentell mit *B. caballi* oder *B. equi* infizierten Pferden dargestellt sind, soll Tab.3 auch die Reaktionen der Seren von Ponies im Verlauf der Infektion, also zum Zeitpunkt des Anstiegs und des Absinkens der Antikörperkonzentration aufzeigen.

Das 3 Wochen p.i. gewonnene *B. equi*-Serum ergab mit homologem Antigen Titer von 1:512. Mit heterologem Antigen reagierte es nicht oder nur in Titern von 1:16 und 1:32. In der 7.Woche p.i. stiegen die Konzentrationen im homologen System bis 1:2048. Gleichzeitig erhöhten sich die Reaktionen im heterologen Bereich um eine Verdünnungsstufe, also auch hier nur bis max. 1:64 mit *B. major*-Antigen. Als die Titer in der 19.Woche auf 1:64 im homologen System abfielen, lagen die Reaktionen in heterologen Systemen wieder bei 1:16 oder im negativen Bereich. (Tab.3).

Bei *B. caballi*-Seren zeigte sich ein ähnliches Bild. Im homologen System stiegen die Titer von 1:256 (1.Woche p.i.) auf 1:4096 (3.Woche p.i.) und sanken auf 1:512 (7.Woche p.i.); dabei nahmen die Kreuzreaktionen mit dem *B. canis*-, *B. major*-, *B. muscoli*- und *B. divergens*-Antigen um 2 Verdünnungsstufen von 1:128 auf 1:512, von 1:64 auf 1:256, von negativ auf 1:32 und von 1:16 auf 1:64 zu. Gegen die anderen kleinen und polymorphen Babesienarten stiegen die Titer nur um eine Verdünnungsstufe an (Tab.3). Nach 7 Wochen p.i.waren die heterologen Reaktionen wieder abgefallen.

Auch bei den Kreuzreaktionen zwischen den beiden Babesienarten des Pferdes zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen den Endtitern im homologen und heterologen System. Im Verlauf der Infektion stiegen die Titer des *B. equi*-Antiserums von 1:512 (3 Wo. p.i.) auf 1:2048 (7 Wo. p.i.) mit dem homologen Antigen, von 1:16 auf 1:32 mit dem *B. caballi*-Antigen an. Sie fielen

wieder auf Titer von 1:64 bzw. 1:16 ab (Abb.1).

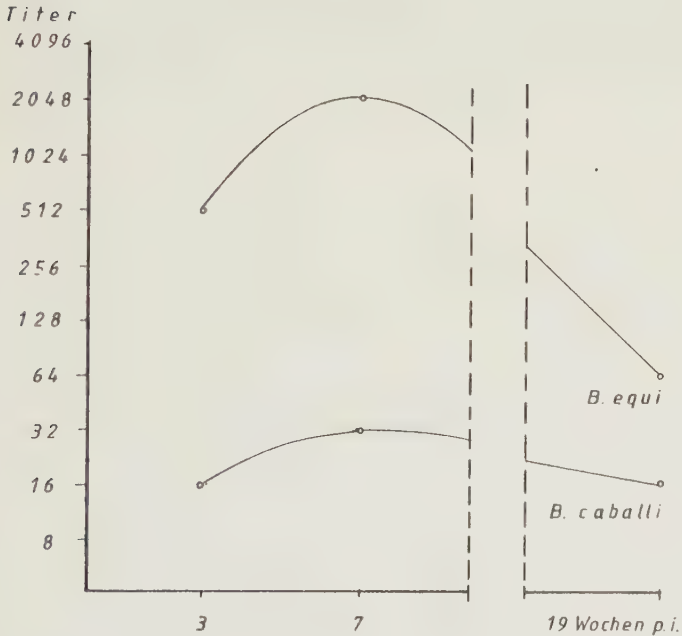


Abb.1. Nachweis der Antikörper eines mit *B. equi* infizierten Pony mit homologem und heterologem (*B. caballi*) Antigen 3, 7 und 19 Wochen nach der Infektion

Umgekehrt brachte *B. caballi*-Serum bei einem Titer von 1:256 1 Woche p.i. Titer von 1:32 mit dem *B. equi*-Antigen; es erreichte 3 Wochen p.i. Titer von 1:4096 mit homologem, dagegen nur 1:64 mit heterologem Antigen. Hier fielen die Titer

7 Wochen p.i. wieder auf 1:512 und 1:32 ab (Abb.2).

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen außerdem, daß die Titerdifferenzen zwischen homologem und heterologem System von *B. equi* und *B. caballi*, also die Spezifität des IFAT, bei den maximalen Antikörperkonzentrationen am stärksten ausgeprägt sind.

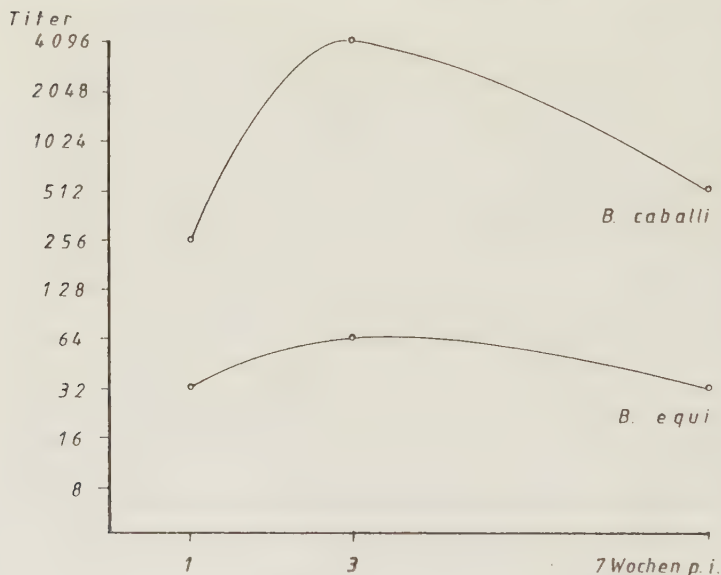


Abb.2. Nachweis der Antikörper eines experimentell mit *B. caballi* infizierten Pony mit homologem und heterologem (*B. equi*) Antigen 1, 3 und 7 Wochen nach der Infektion

Dagegen sind bei frischen und latenten Infektionen mit niedrigen Antikörperkonzentrationen im Serum die Unterschiede weniger deutlich. Zwischen 1. und 7. Woche bzw. 3. und 19. Woche p.i. konnten beide Babesienarten auf Grund der Titerunterschiede mit dem IFAT unterschieden werden.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel meiner Arbeit war es, die Eignung des IFAT zur artspezifischen Diagnose von Babesieninfektionen bei Maus, Hund, Rind und Pferd zu überprüfen. Dazu testete ich babesienspezifische Hochimmunseren von Kaninchen und Infektionsseren der Wirtstiere mit homologen und im Vergleich dazu mit heterologen Antigenen im IFAT aus.

Die Hochimmunseren lieferten deutlich artspezifische Ergebnisse im IFAT. Seren gegen die polymorphe Art *Babesia microti* und gegen die kleinen Arten *B. gibsoni* und *B. equi* reagierten nur mit den homologen Antigenen. *B. rodhaini*-Serum reagierte mit den Antigenen der anderen polymorphen Babesienarten der Maus *B. microti* und *B. musculi* und der kleinen Art *B. divergens*, aber in wesentlich niedrigeren Verdünnungsstufen (1:16 - 1:32) als im homologen System (1:512), ebenso *B. musculi* mit *B. major*-Antigen. Kreuzreaktionen traten zwischen den großen Babesienarten *B. canis*, *B. major* und *B. caballi* auf; sie blieben aber stets unter den Endtitern, die in den homologen Systemen erreicht wurden. Eine Sonderstellung zwischen großen und kleinen Babesienarten nahm *B. divergens* ein. Als kleine Babesienart des Rindes reagierte sie mit den großen Babesienarten kreuz, nicht aber mit den kleinen.

Die in unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufgetretenen Kreuzreaktionen zwischen *B. canis*, *B. major*, *B. caballi* und *B. divergens*, die aber stets unter den Reaktionen in den homologen Systemen blieben, machen gemeinsame Teilantigene wahrscheinlich. Schon ZWART und Mitarb. (1968) stellten gemeinsame Antigene zwischen den beiden großen Babesienarten des Rindes *B. bigemina* und *B. major* auf Grund von positiven

Reaktionen mit dem heterologen Antigen in niedrigen Verdünnungsstufen im IFAT fest. Auch LEEFLANG und PERIE (1972) vermuteten neben speziesspezifischen auch gruppenspezifische Antigene von *B. major*, *B. bigemina*, *B. divergens* und *B. bovis*; bei ihren IFA-Tests waren die Titer in den verschiedenen heterologen Systemen zum einen stets niedriger, zum anderen zeigten sie auch untereinander Unterschiede.

GOLDMAN und ROSENBERG (1974) teilten die kleinen Babesienarten des Rindes anhand ihrer Kreuzreaktionen im IFAT unterschiedlich ein; die Gruppe I umfaßte *B. divergens*, Gruppe II *B. bovis*, *B. argentina* und *B. berbera* und die Gruppe III *B. major*. Dabei ordneten sie *B. major* zwischen die großen und kleinen Babesienarten ein. Außerdem vermuteten LYKINS und Mitarb. (1975) gemeinsame und spezifische Antigene von *B. canis* und *B. microti* auf Grund auftretender Kreuzreaktionen im IFAT; dies widerspricht den Ergebnissen meiner Untersuchungen. Überhaupt reagierten bei den polymorphgestaltigen und kleinen Babesienarten nur die Antigene von *B. musculi* und *B. microti* mit *B. rodhaini*-Antiserum und *B. equi*-Antigen mit *B. caballi*-Antiserum in nur sehr niedrigen Verdünnungsstufen. *B. rodhaini*- und *B. gibsoni*-Antigene reagierten nicht mit den heterologen Immunsereen. Daher besitzen die kleinen und polymorphen Arten vermutlich eine sehr spezifische und homogene Antigenstruktur.

Dies stimmt mit den Erkenntnissen von ANDERSON, MAGNARELLI und KURZ (1979) überein; sie sahen das *B. microti*-Antigen als spezifisch an, da *B. bigemina*-, *B. argentina*-, *B. caballi*- und *B. equi*-Seren nicht damit reagierten. Auch bei CHISHOLM und Mitarb. (1978) reagierten menschliche positive *B. microti*-Seren entweder gar nicht oder nur in sehr niedrigen Titern mit *B. equi*-Antigen. Außerdem sahen GOLDMAN, PIPANO und ROSENBERG (1972) die große Babesienart *B. bigemina* und die kleine

B. berbera als antigenetisch verschieden an, da keine Kreuzreaktionen zwischen ihnen festgestellt wurden. Die Ergebnisse von den Hochimmunseren zeigen, daß mit dem IFAT eine artspezifische Diagnose möglich ist.

RISTIC, LYKINS und SMITH (1971) sehen sogar die immunologische Spezifität, die durch Antigen-Antikörper-Reaktionen demonstriert wird, zur Feststellung der phylogenetischen Beziehungen unter den Protozoen als sensitiveres und spezifischeres Mittel als die morphologische Differenzierung an. Die vermehrte Anwendung moderner immunserologischer Techniken zum Studium von Blutprotozoen in den letzten Jahren zeigt, daß diese Organismen auf ähnlicher Basis geordnet und gruppiert werden können wie bei der Klassifizierung von vielen Bakterien. Hier bietet sich der IFAT auf Grund seiner speziesspezifischen Reaktionen an. Dazu sollte aber die Hochimmunserumherstellung verbessert und standardisiert werden.

Auch bei der Untersuchung der Infektionsseren konnte mit dem IFAT zwischen den Babesienarten von Maus, Hund, Rind und Pferd differenziert werden; die auftretenden positiven Reaktionen im heterologen System waren stets niedriger als im homologen. So konnten die Babesienarten der Maus, B. musculi, B. rodhaini und B. microti deutlich voneinander getrennt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von HICKERTON und JONES (1981), HENKEL (1982) sowie COX und TURNER (1970).

Bei CHISHOLM und Mitarb. (1978) reagierten menschliche B. microti-Seren ebenfalls nur in niedrigen Titern mit B. equi-Antigen. Weiterhin traten Kreuzreaktionen wie in den IFA-Tests von RISTIC, LYKINS und SMITH (1971) zwischen den Babesien des Hundes B. canis und B. gibsoni bis zu Serumverdünnungen von 1:32 - 1:64 auf, lagen damit aber noch 3-4 Verdünnungsstufen unter den Endtitern mit den homologen Antigenen (ANDERSON, MAGNARELLI und SULZER, 1980). Außerdem konnten B. major und

und *B. divergens*, Babesienarten des Rindes, auf Grund hoher Titer im homologen und niedriger Antikörperkonzentrationen im heterologen System unterschieden werden. Die Ergebnisse von JOYNER und Mitarb. (1972) sowie von MORZARIA, BROCKLESBY und HARRADINE (1977) konnten damit bestätigt werden.

Am eindeutigsten gelang mit dem IFAT die Differenzierung von *B. caballi* und *B. equi*, den Babesienarten des Pferdes. Darauf haben schon MERKLE (1983), MADDEN und HOLBROCK (1968) sowie REHBEIN und HEIDRICH-JOSWIG (1983) hingewiesen. Darüberhinaus traten auch hier verstärkt Kreuzreaktionen zwischen *B. canis*, *B. major*, *B. caballi* und *B. divergens* auf; es bestätigt die Vermutung einer antigenen Verwandtschaft dieser Babesienarten.

Beim vergleichenden Austesten von Infektionsseren des Pferdes nach unterschiedlicher Infektionsdauer konnte ich eine direkte Korrelation zwischen den Titern im homologen und heterologen System feststellen. Stiegen die Titer gegen das homologe Antigen an, nahmen auch die Kreuzreaktionen in geringem Maße zu. So war es WEILAND und KRATZER (1979) möglich, Titerverlaufskurven von *B. canis*- und *B. gibsoni*-Infektionen beim Hund mit *B. rodhaini*-Antigen zu erarbeiten. Weiterhin konnten WEILAND und Mitarb. (1980) mit *B. rodhaini*-Antigen die Antikörperbildung in mit *B. divergens* infizierten Jungrindern beobachten. Allerdings waren in meinen Untersuchungen zum Zeitpunkt der Maximaltiter im homologen System die Titerdifferenzen zu den heterologen Systemen am größten, während latenter Infektionen mit niedrigen Serum-Antikörperkonzentrationen am niedrigsten. Also ergibt sich auf Grund größerer Titerdifferenzen bei hohen Antikörperkonzentrationen auch eine höhere Spezifität des IFAT. Darauf weisen auch die Ergebnisse von JOYNER und Mitarb. (1972) sowie LEEFLANG und PERIE (1972) bei der Differenzierung von Babesien-Infektionen des Rindes mit dem IFAT hin;

die Kreuzreaktionen blieben stets in derselben niedrigen Verdünnungsstufe unabhängig vom Titeranstieg im homologen System.

In den IFA-Tests zur Diagnose von Babesia-Infektionen wurde entweder fixiertes oder luftgetrocknetes Antigen eingesetzt. Als Fixiermedien wurden neben Methanol, Äthanol, Formalin oder eine aus diesen zusammengesetzte Lösung, vor allem Aceton gewählt. TAMURA und Mitarb. (1980) beurteilten bei der Entwicklung des IFAT zur Diagnose von Babesia gibsoni-Infektionen des Hundes die Qualität der Antigene nach Fixierung mit absolutem Äthanol, 95%igem Äthanol, 5%iger Essigsäure in 95%igem Äthanol, 1%iger Essigsäure in 95%igem Äthanol, 10%igem Formalin, absolutem Aceton und Heißluft (100°C) sowie nach Lufttrocknung. Unfixiertes Antigen und in kaltem Aceton fixiertes Antigen lieferten die besten Ergebnisse. Unfixiertes luftgetrocknetes Antigen wurde nun mit acetonfixiertem Antigen verglichen. Zunächst war bei unfixiertem Antigen die Fluoreszenz bei positiver Reaktion stets stärker und deutlicher ausgeprägt als bei fixiertem Antigen. Die Endtiter waren deshalb sicherer abzulesen. JOHNSTON, PEARSON und LEATCH (1973) konnten ebenfalls deutliche Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz zwischen der letzten positiven Verdünnungsstufe und der ersten negativen bei Verwendung luftgetrockneter Babesia argentina-Antigene beobachten.

Nur bei den Antigenen der polymorphen Arten B. musculi, B. rodhaini, B. microti ließ die Acetonfixierung die Titer stets um eine Stufe herabsinken und somit auch ihre Reaktionen mit heterologen Seren von Titer 1:16 in den negativen Bereich rücken. Bei den anderen Antigenen sanken die Reaktionen mit den homologen und heterologen Seren nicht einheitlich um eine Titerstufe ab, so daß nach Acetonfixierung die Titerdifferenzen zwischen homologen und heterologen Systemen, also auch die Spezifität des IFAT, vermindert wurden.

Deshalb erwies sich in meinen Untersuchungen die Lufttrocknung der Antigene als optimal. Bereits CHISHOLM und Mitarb. (1978) und ANDERSON, MAGNARELLI und SULZER (1980) konnten mit unfixierten Babesienantigenen ein hohes Maß an Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des IFA-Tests feststellen.

Dagegen hielten TANURA und Mitarb. (1980) die Acetonfixierung für geeigneter als die Lufttrocknung von *Babesia gibsoni*-Antigenen. Die unfixierten Blutfilme lösten sich bei ihnen manchmal während der Waschvorgänge ab, was in meinen Untersuchungen nicht festzustellen war. Weiterhin waren sie der Ansicht, daß die Acetonfixierung das Hämoglobin aus den Erythrozyten besser entfernen konnte als alle anderen Verfahren.

V. Zusammenfassung

Zur Überprüfung der indirekten Immunfluoreszenz als artspezifische serodiagnostische Methode bei Babesieninfektionen wurden Hochimmunseren und Infektionsseren in verschiedenen Verdünnungsstufen mit homologen und heterologen Antigenen ausgetestet.

Spezifische Hochimmunseren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit somatischem Antigen von *Babesia rodhaini*, *B. microti*, *B. musculi*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. major*, *B. divergens*, *B. caballi* und *B. equi* hergestellt. Die Entnahme hochtitriger Infektionsseren von Maus, Hund, Rind und Pferd erfolgte frühestens 3, spätestens 7 Wochen p.i..

Bei Untersuchung sowohl der Immunseren als auch der Infektionsseren erwies sich luftgetrocknetes Antigen fixiertem Antigen überlegen.

Alle Immunseren reagierten mit den homologen Antigenen mit Titern bis zu 1:2048, mit den heterologen dagegen nicht oder nur in niederen Konzentrationen; diese lagen 2-6 Titerstufen unter den Endtitern im homologen System. Kreuzreaktionen traten nur zwischen *Babesia canis*, *B. major*, *B. divergens* und *B. caballi* auf. Die Reaktionen der Immunseren im IFAT weisen diesen Test als für geeignet aus, Babesienarten serologisch zu differenzieren.

Die Infektionsseren erreichten Titer bis zu 1:4096 mit den homologen Antigenen. Kreuzreaktionen zwischen *Babesia musculi* und *B. microti*, *B. canis* und *B. gibsoni*, *B. major* und *B. divergens* und zwischen *B. caballi* und *B. equi* ergaben deutlich niedrigere Antikörperkonzentrationen. Stärkere Kreuzreaktionen traten nur zwischen den großen Babesienarten *B. canis*, *B. major* und *B. caballi* auf; sie erreichten aber

nicht die Titer in den homologen Systemen.

Babesia caballi- und *B. equi*-Antiseren brachten zum Zeitpunkt des Anstiegs der Antikörperkonzentrationen (1. und 3. Woche p.i.) Titer von 1:256 und 1:512, zum Zeitpunkt des Abfallens der Antikörperkonzentrationen (7. und 19. Woche p.i.) Titer von 1:512 und 1:64 mit den homologen Antigenen; mit den heterologen Antigenen reagierten sie nicht oder in niedrigeren Verdünnungsstufen als die hochtitrigen *B. caballi*- (1:4096) und *B. equi*- (1:2048) Seren. Hohe Titerunterschiede ermöglichten eine klare Differenzierung zwischen *B. caballi* und *B. equi* sowohl bei frischer als auch latenter Infektion. Die Titerdifferenzen zwischen homologem und heterologem System waren zum Zeitpunkt der maximalen Antikörperkonzentration am größten.

Obwohl bei hohem Antikörpertiter mit homologem Antigen Reaktionen mit heterologen Antigenen in niedrigen Titern auftreten können, ist mit dem IFAT eine artspezifische Diagnose von Babesieninfektionen möglich.

Plössl, J.: Investigations concerning the specificity of the indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the detection of Babesia antibodies to different Babesia species

Summary

For the examination of the indirect immunofluorescence as a species-specific serodiagnostic method in Babesia infections hyperimmune sera and infection sera were tested in different degrees of dilution with homologous and heterologous antigens.

Specific hyperimmune sera were produced by immunization of rabbits with somatic antigens of Babesia rodhaini, B. microti, B. musculi, B. canis, B. gibsoni, B. major, B. divergens, B. caballi and B. equi. Infection sera of mouse, dog, cattle and horse with high titers were first taken 3 weeks p.i. and last 7 weeks p.i..

On examination of both immune sera and infection sera air-dried antigen proved superior to fixed antigen. All the immune sera reacted with homologous antigens with titers up to 1:2048 whereas there were no reactions with the heterologous antigens or only when in low concentrations; these lay 2-6 titer degrees below the endtiters in the homologous system. Cross-reactions occurred only between Babesia canis, B. major, B. divergens and B. caballi. The reactions of immune sera in the IFAT prove the aptitude of this test for the serological differentiation of Babesia species.

The infection sera reached titers up to 1:4096 with the homologous antigens. Cross-reactions between Babesia musculi

and *B. microti*. *B. canis* and *B. gibsoni*, *B. major* and *B. divergens* and between *B. caballi* and *B. equi* resulted in distinctly lower antibody concentrations. Stronger cross-reactions occurred only between the large *Babesia* species *B. canis*, *B. major* and *B. caballi*; but they didn't reach the titer in the homologous system.

When antibody concentration increased (1st and 3rd weeks p.i.) the antisera of *Babesia caballi* and *B. equi* gave titers of 1:256 and 1:512, when antibody concentration decreased (7th and 19th weeks p.i.), titers of 1:512 and 1:64 with the homologous antigens; there were no reactions with the heterologous antigens or only in lower degrees of dilution than with sera of *B. caballi* (1:4096) and *B. equi* (1:2048) with high titers. High differences of titers rendered a clear differentiation between *B. caballi* and *B. equi* possible, in fresh as well as in latent infections. The differences of the titers between the homologous and heterologous system were highest when the antibody concentration was at its maximum.

Although the sera reaching high antibody titers with homologous antigens may react with heterologous antigens in low titers, the IFAT provides a species-specific diagnosis of *Babesia* infections.

VI. Literaturverzeichnis

- Anderson, J.F., L.A. Magnarelli, J. Kurz (1979): Intraerythrocytic parasites in rodent populations of Connecticut: *Babesia* and *Grahamella* species. J. Parasit. 65, 599 - 604
- Anderson, J.F., L.A. Magnarelli, A.J. Sulzer (1980): Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. Am. J. Vet. Res. 41, 2102 - 2105
- Applewhaite, L.M., T.M. Craig, G.G. Wagner (1981): Serological prevalence of bovine babesiosis in Guyana. Trop. Anim. Hlth Prod. 13, 13 - 18
- Benach, J.L., D.J. White, J.P. McGovern, M.M. Jacovina (1979): Immunological relationships of Long Island isolates of *Babesia microti*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28, 643 - 648
- Blewett, D.A., K.M.G. Adam (1978): A serological survey for *Babesia* in cattle in Scotland. I. Assessment of the method by the results from the outlying islands. Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 405 - 415
- Brocklesby, D.W., D. Zwart, N.M. Perié (1971): Serologic evidence for the identification of *Babesia major* in Britain. Res. Vet. Sci. 12, 285 - 287
- Burridge, M.J., C.D. Kimber, N. McHardy (1973): Detection of antibodies to *Babesia bigemina* in dried blood samples using the IFAT. Ann. Trop. Med. Parasit. 67, 191 - 195

- Callow, L.L., G.K. Kanhai, A. Vandenberghe (1981): Serological comparison of strains of *Babesia bovis* occurring in Australia and Mozambique.
Trop. Anim. Hlth Prod. 13, 79 - 82
- Callow, L.L., W. McGregor, R.J. Parker, R.J. Dalgliesh (1974 a): Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host with observation on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test.
Austr. Vet. J. 50, 12 - 15
- Callow, L.L., W. McGregor, R.J. Parker, R.J. Dalgliesh (1974 b): The immunity of cattle to *Babesia argentina* after drug sterilisation of infections of varying duration.
Austr. Vet. J. 50, 6 - 11
- Callow, L.L., W. McGregor, B.J. Rodwell, R.J. Rogers, G.C. Fraser, D.F. Mahoney, G.M. Robertson (1979): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test to diagnose *Babesia equi*-infection in horses.
Austr. Vet. J. 55, 555 - 559
- Chisholm, E., T.K. Ruebush, A.J. Sulzer, G.R. Healy (1978): *Babesia microti* infection in man: Evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27, 14 - 19
- Cox, F.E.G., S.A. Turner (1970): Antibody levels in mice infected with *Babesia microti*.
Ann. Trop. Med. Parasit. 64, 167 - 173

- Donnelly, J., L.P. Joyner, P.J. Crossman (1972): The incidence of *Babesia divergens* infection in a herd of cattle as measured by the indirect immunofluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 13, 511 - 514
- Donnelly, J., L.P. Joyner, O. Graham-Jones, C.P. Ellis (1980 a): A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the Sultanate of Oman.
Trop. Anim. Hlth Prod. 12, 50 - 60
- Donnelly, J., L.P. Joyner, C. Frank (1980 b): Quantitative epidemiological studies on the prevalence of babesiosis in horses in Kuwait.
Trop. Anim. Hlth Prod. 12, 253 - 258
- Fujinaga, T., T. Minami (1981): Indirect fluorescent antibody and complement fixation tests in the diagnosis of bovine theileriosis and babesiosis in Japan.
Vet. Parasitol. 8, 115 - 126
- Fujinaga, T., T. Minami, T. Ishihara (1980): Serological relationship between a large *Babesia* found in Japanese cattle and *Babesia major*, *B. bigemina* and *B. bovis*.
Res. Vet. Sci. 29, 230 - 234
- Goldman, M., E. Pipano, A.S. Rosenberg (1972): Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *B. berbera*.
Res. Vet. Sci. 13, 77 - 81

- Goldman, M., E. Pipano (1974): Serological response in field cattle immunised against *Babesia berbera*.
Trop. Anim. Hlth Prod. 6, 123 - 127
- Goldman, M., A.S. Rosenberg (1974): Immunofluorescence studies of the small *Babesia* species of cattle from different geographical areas.
Res. Vet. Sci. 16, 351 - 354
- Gray, J.S., A.J. DeVos (1981): Studies on a bovine *Babesia* transmitted by *Hyalomma marginatum rufipes* Koch 1844.
Onderstepoort J. Vet. 48, 215 - 223
- Henkel, H. (1982): Die Bedeutung von Kleinsäugern als Reservoir für *Babesia divergens* und *Babesia microti* in der Umgebung von Bad Tölz.
Vet. med. Diss., München
- Hickerton, J.P., T.W. Jones (1981): The serological differentiation of *B. rodhaini*, *B. microti* and *B. muratovi* with a fluorescent antibody staining technique.
Ann. Trop. Med. Parasit. 75, 473 - 474
- Johnston, L.A.Y., L. Tammemagi (1969): Bovine babesiosis: duration of latent infection and immunity to *Babesia argentina*.
Austr. Vet. J. 45, 445 - 449
- Johnston, L.A.Y., R.D. Pearson, G. Leatch (1973): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle.
Austr. Vet. J. 49, 373 - 377

- Joyner, L.P., J. Donelly, R. Payne, D.W. Brocklesby (1972):
The indirect fluorescent antibody test for the
differentiation of infections with *Babesia major*.
Res. Vet. Sci. 13, 515 - 518
- Kuttler, K.L., L.G. Adams, R.A. Todorovic (1977): Comparisons
of the complement-fixation and indirect fluorescent
antibody reactions in the detection of bovine
babesiasis.
Am. J. Vet. Res. 38, 153 - 156
- Kuvin, S.F., J.E. Tobic, C.V. Evans, R.R. Coatney, P.G.
Contagos (1962): Antibody production in human malaria
as determined by the fluorescent antibody technique.
Science 135, 1130
- Leeflang, P., N.M. Perić (1972): Comparative immunofluorescent
studies on 4 *Babesia* species of cattle.
Res. Vet. Sci. 13, 342 - 346
- Löhr, K.F., J.P.J. Ross (1968): Ein Beitrag zur Verbesserung
des indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Tests bei der
Diagnose intraerythrozytärer Parasiten.
Z. Trop. Parasit. 19, 427 - 430
- Ludford, L.G., W.T.K. Hall, A.J. Sulzer, M. Wilson (1972):
Babesia argentina, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*:
Antigenic crossreactions.
Exp. Parasitol. 32, 317 - 326
- Lykins, J.D., M. Ristic, R.M. Weisinger, D.L. Huxsoll (1975):
Babesia microti: pathogenesis of parasite of human
origin in the hamster.
Exp. Parasitol. 37, 388 - 397

- Madden, P.A., A.A. Holbrock (1968): Equine piroplasmosis: indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*.
Am. J. Vet. Res. 29, 117 - 123
- Merkle, F.J. (1983): Untersuchungen über die Brauchbarkeit von KBR, IFAT und ELISA zum Nachweis der *Babesia caballi*-Infektion des Pferdes.
Vet. med. Diss., München
- Morzaria, S.P., D.W. Brocklesby, D.L. Harradine (1977): Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for *Babesia major* and *Theileria mutans* in Britain.
Vet. Rec. 100, 484 - 487
- Nicholls, M.J., G. Ibata, F.V. Rodas (1980): Prevalence of antibodies to *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in dairy cattle in Bolivia.
Trop. Anim. Hlth Prod. 12, 48 - 49
- Payne, R.C. (1978): Cryopreservation of bovine blood infected with *Babesia major* for use in the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 24, 375
- Rehbein, G., S. Heidrich-Joswig (1983): Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody test and complement fixation test.
Vet. Parasitol. 12, 135 - 145

- Ristic, M., J.D. Lykins, A.R. Smith (1971): *Babesia canis* and *Babesia gibsoni*: Soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs.
Exp. Parasitol. 30, 385 - 392
- Ross, J.P.J., K.F. Löhr (1968): Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 9, 557 - 562
- Schindler, R., R. Wokatsch (1965): Versuch zur Differenzierung der Theilerienspezies des Rindes durch serologische Untersuchungen.
Z. Tropenmed. Parasit. 16, 17 - 23
- Schindler, R., D. Mehlitz (1968): Ein Beitrag zur Technik des indirekten Coontests für den Nachweis von Antikörpern gegen intraerythrozytäre Protozoen unter besonderer Berücksichtigung der Theilerien.
Z. Tropenmed. Parasit. 19, 430 - 441
- Tamura, T., K. Takahashi, M. Sonada, M. Koiwa (1980): The indirect fluorescent antibody test as a method for detecting antibody in dogs infected with *Babesia gibsoni*.
J. Coll. Dair. 8, 249 - 256
- Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis: a review.
Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 1 - 14
- Todorovic, R.A., R. Garcia (1978): Comparison of the dried blood on filter paper and serum techniques for the diagnosis of bovine babesiosis utilizing the indirect fluorescent antibody (IFA) test.
Tropenmed. Parasit. 29, 88 - 94

- Todorovic, R.A., R.F. Long (1976): Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. infections in Colombian cattle
Tropenmed. Parasitol. 27, 169 - 181
- Trees, A.I. (1978): Indirect fluorescent antibody levels in experimental *Babesia divergens* infections of cattle.
Res. Vet. Sci. 24, 126 - 128
- Voller, A., R.S. Bray (1962): Fluorescent antibody staining as a measure of malaria antibody.
Proc. Soc. exp. Biol. 4, 907
- Weiland, G., I. Kratzer (1979): Fluoreszenz- und enzymserologische Untersuchungen zum Nachweis der latenten Hundebabesiose.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 398 - 400
- Weiland, G., L. Reif, M. Schmidt, J. Boch (1980): Serologische Untersuchungen zum Nachweis der *Babesia divergens*-Infektion des Rindes.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 261 - 264
- Weller, T.H., A.H. Coons (1954): Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 786 - 794
- Winter, H. (1967): Diagnosis of babesiosis by fluorescence microscopy.
Res. Vet. Sci. 8, 170
- Zwart, D., M.C. Van den Ende, B. Kouwenhoven, J. Buys (1968): The difference between *B. bigemina* and a Dutch strain of *B. major*.
Tijdschr. Diergeneesk. 93, 126 - 140.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c.. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung während meiner Arbeit.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dr. Weiland für die Betreuung in fachlichen Fragen.

Bei den Mitarbeitern des Instituts, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, möchte ich mich auch an dieser Stelle bedanken.

Lebenslauf

Name: Juliane Rita Plössl
geboren am 05.09.1958

Geburtsort: Nabburg

Eltern: Siegfried Plössl (Kaufmann)
Erika Plössl, geb. Feller

Schulbildung: 1964 - 1968 Volksschule Nabburg
1968 - 1977 Gymnasium Nabburg
Juni 1977 Abitur

Studium der
Veterinärmedizin: 1977 - 1982 Ludwig-Maximilians-
Universität München

Staatsexamen: November 1982

Approbation: Januar 1983

Promotionsstudium: seit Dezember 1982 mit der Anfertigung
der vorliegenden Arbeit am Institut für
Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie beschäftigt.

